

Simulated Moving Bed를 이용한 Bupivacaine 키랄분리 (1) Preparative Chromatography를 이용한 기본조건 결정

윤지연* · 이종기† · 서성섭* · 최민호* · 박태진

한국과학기술연구원 나노환경기술연구센터

136-791 서울시 성북구 하월곡동 39-1

*홍익대학교 화학공학과

121-791 서울시 마포구 상수동 72-1

(2003년 7월 28일 접수, 2003년 10월 20일 채택)

Chiral Separation of Bupivacaine by Simulated Moving Bed (1) Optical Separation Conditions for Preparative Chromatography

Jee Yeon Yoon*, Joong Kee Lee†, Sung-Sup Suh*, Min-Ho Choi* and Tae-Jin Park

Eco-Nano Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology,

39-1, Hawolgok-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

*Department of Chemical Engineering, Hongik University, 72-1, Sangsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea

(Received 28 July 2003; accepted 20 October 2003)

요 약

Racemate Bupivacaine의 키랄분리를 위한 크로마토그래피의 최적분리조건을 조사하였다. Kromasil® 키랄고정상에서 최적 이동상 조성 성분은 n-hexane/2-propanol/acetic acid/triethylamine, 99/1/0.3/0.05(vol.%)이었다. 이동상 조성성분인 2-propanol의 부피비가 증가할수록 체류시간과 분리도가 동시에 감소되었다. 이동상 성분 중에서 미량으로 존재하는 triethylamine이 증가할수록 피크의 sharpness가 증가하고 체류시간 역시 감소하였다. 또한, acetic acid가 없으면, 크로마토그래피 광학분할이 불가능하였으며 부피 0.3%에서 분리도가 가장 높음을 확인할 수 있었다. 한편, 키랄의약품의 대량분리방법중의 하나인 SMB(simulated moving bed)크로마토그래피 시스템(직경 1.0 cm×10 cm×8개 칼럼으로 구성)의 최적분리조건을 전산모사에 의해 구하였으며, 이를 실험으로 확인하였다. 그 결과 switching time 15분, feed의 유량 0.1 ml/min, desorbent 0.86 ml/min, raffinate 0.3 ml/min, extract 0.66 ml/min, recycle 1.0 ml/min일 때 100% 순도의 R-form과 S-form을 얻을 수 있었으며, 실험치와 전산모사치간의 오차는 $\pm 2\%$ 이내였다.

Abstract – The chiral separation of racemate Bupivacaine was carried out to find the optimum condition for chromatographic system. The optimum species and composition for mobile phase were n-hexane/2-propanol/acetic acid/triethylamine, 99/1/0.3/0.05(vol.%) in case Kromasil® chiral stationary phase was employed. The retention time and resolution decreased with the increase in the ratio of 2-propanol in the mobile phase. The sharpness of peak and retention time decreased, as the content of triethylamine increased. Without the existence of acetic acid, the chromatographic separation didn't occur, and the resolution was the highest at the acetic acid volume ratio of 0.3%. The optimum condition of SMB (simulated moving bed) was determined by simulation and its results was compared with experimental data from lab-scale SMB (10 mm ID×8 ea). Based on the SMB simulation and experimental results, 100% purity of R and S Bupivacaine were obtained and the error between the calculated and experimental value was within $\pm 2\%$.

Key words: Bupivacaine, SMB, Chiral Separation, Enantiomer

1. 서 론

키랄(chiral)이란 두 분자가 서로 겹칠 수 없는 3차원적 구조에 기인하여 거울상의 관계에 있는 경우를 일컬으며 이런 거울상 이성질체의 의약품을 키랄 의약품이라고 부른다. 키랄 의약품은 키랄 환경이 아닌

보통의 조건에서는 물리적, 화학적 성질이 동일하지만 생체내와 같은 키랄환경에서는 흡수 및 대사, 수용체와의 상호작용 등에 있어 각각 다른 생리 활성을 나타낸다. 따라서 초기에는 임상결과 안전한 의약품으로 사용되었으나 수십년 후 이성질체로 인한 독성이 밝혀진 사례가 보고된 바 있다[1].

이와 같은 부작용을 방지하고자 1980년대에 들어 광학이성질체들을 분리하고 광학순도를 측정하는 기술이 개발되기 시작하였다. 특히 1992

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: leejk@kist.re.kr

년부터 미국의 FDA(food and drug administration)는 서로 다른 의약품 활성을 지니고 있는 이성질체로 이루어진 약물의 경우 판매 전 각 이성질체별 특성을 고지해야 한다는 규제와 더불어 단일 이성질체만을 사용한 광학활성 의약품의 생산을 권장하고 있다. 이에 따라 키랄 의약품은 광학분리하기 위한 고도분리 기술의 중요성이 증대하게 되었다.

단일 이성질체의 키랄약품 개발 방향은 새 합성방법개발과 기존의 라세미 혼합물을 분리하는 방법이 있으나 크로마토그래피 기술에 의한 단일 이성질체 분리기술은 비대칭 합성 및 효소고정화방법과 같은 새로운 합성방법에 비해 시간과 개발비를 크게 줄일 수 있다. 또한 크로마토그래피 기술은 다른 분리방법에 비해 낮은 에너지를 사용하는 장점이 있으며 특히 상온에서 분리가 주로 이루어져 열에 민감한 의약품에 적합하다. 더불어 효율적인 키랄 고정상의 개발은 광학이성질체를 분리하는 산업용 크로마토그래피의 적용을 촉진시켜왔다[2]. 순수한 광학이성질체를 분리하고 batch 크로마토그래피의 단점을 피하기 위하여 새로운 개념의 크로마토그래피 공정법인 SMB(simulated moving bed)의 적용이 증가하였다. SMB공정은 1960년대 초 미국의 UOP사의 C_8 hydrocarbon에서 para-xylene을 분리하는 데서 개발되기 시작했다[3]. 이어 silicagel이나 이온교환수지를 packing물질로 이용하여 석유화학물, 설탕 등 다양한 화합물을 분리하는데 널리 적용되어왔다[4].

SMB 크로마토그래피 기술은 흡착력이 다른 두 물질을 분리하는 연속식 공정기술의 하나로 용매 소비량이 적고 고정상의 질량당 생산량이 높은 것으로 알려져 있다. 그러므로 batch 크로마토그래피의 단점인 용질의 희석과 흡착제(adsorbent)의 낮은 효율성을 연속식 크로마토그래피인 SMB를 사용하여 개선시킬 수 있다. SMB는 분석 스케일에서 제조용 스케일로의 스케일 업이 단시간에 이루어지는데 이는 동일한 고정상과 이동상을 사용하기 때문이다[5]. 이런 장점은 신약의 개발에서부터 시장에 나아가기까지의 시간을 줄여준다. SMB 크로마토그래피는 최근 생명공학, 약학, 정밀화학 분야에 적용되고 있으며 특히 키랄공학과 관련되어 이성질체 분리에 많은 연구가 되고 있다. 이제까지 amino acid, ascomycin, 1-phenyl-1-propanol, 1,1'-bi-2-naphthol, Tröger's base compound 등의 이성질체의 SMB 공정 분리에 관한 연구가 보고되었다[6, 7].

본 논문에서는, 라세미 형태의 키랄 의약품을 각각의 광학이성질체, 즉 이성질체로 광학분리하기 위한 크로마토그래피 공정에 대해서 각 변수의 특징을 조사하였다. 연구의 광학분리대상 의약품 시료로는 Bupivacaine, R, S-[1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-piperidine carboxiamide]을 사용하였다(Fig. 1). 본 시약은 효과적인 산부인과용 국소마취제로 널리 사용되고 있다. 그러나 S-(-)이성질체는 마취제로서의 약리적 특성을 갖는 반면 R-(+)이성질체는 중추신경과 심장혈관에 독성을 미친다고 보고된 바 있다[8]. 또한 경구투입이나 피하주사로 투여될 경우 S-(-)이성질체의 경우가 혈장에 좀더 오래 머물러 국소마취제로서의 역할을 더 오래한다고 밝혀졌다[9]. 따라서 라세미 혼합물 상태인 Bupivacaine으로부터 독성을 가진 R-(+)이성질체의 광학분리를 위해 키랄분리용 칼럼을 사용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 실험을 하였다. 이 실험은 평형이론을 바탕으로 크로마토그래피 공정변수 운전법

위를 도출하기 위한 것이다. 또한 이를 바탕으로 $1.0 \times 10 \text{ cm} \times 8$ 개 칼럼으로 구성된 실험실 규모의 SMB 장비를 사용하여 실제 공정의 모사와 실험을 통하여 분리를 위한 최적운전조건을 확인하였다.

2. 이론적 배경

크로마토그래피 실험에서 얻어지는 결과의 분리성능을 정량적으로 표현해 주기 위해서 분리도(resolution)를 적용하였다. 분리도 R은 두 물질간에 관계되는 것으로 식 (1)로 정의된다. 체류시간과 peak 폭의 단위 길이 또는 시간으로 표시되므로 분리도는 무차원이 된다.

$$R = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

여기에서 t_1 , t_2 는 시료 1, 2의 체류시간이며, w_1 , w_2 는 피크 1, 2의 기준선에서의 폭이며 시간 단위로 표시한다.

평형상태에서 알고 있는 양의 고정상에 포함되어 있는 어떤 물질의 양과 이동상에 포함되어 있는 물질의 양간의 관계를 나타내기 위해 흡착평형식으로 Langmuir식을 사용하였다. 특히 본 연구에서는 분리하고자 하는 이성질체가 서로 경쟁흡착을 한다고 가정하여 이성질체의 등온흡착곡선식으로서 Competitive Langmuir 식을 사용하였다. Competitive Langmuir은 아래와 같이 나타낸다. 여기서 n은 시스템내 성분의 수이고 a와 b는 수학적인 계수이다. $q_{s,i}$ 는 고정상 포화용량이다.

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^n b_j C_j} \quad ; i = 1, n \quad \left(q_{s,i} = \frac{a_i}{b_i} \right) \quad (2)$$

크로마토그래피의 경우에서 한 상은 순수한 용매이거나 용액이 되고 나머지 상은 고체상이 되며 이 고체상이 흡착제가 된다. 액체-고체 평형에서 흡착되는 물질은 고정상의 표면에 흡착되기 위해 항상 경쟁적인 양상을 나타낸다. 결과적으로 대부분의 액체-고체 평형에 대한 이해는 실험적이다.

흡착평형식을 결정하는 방법 중 하나가 용출곡선을 이용한 동적방법, PIM(pulsed-input method)이다. 크로마토그래피에서 시료가 칼럼을 통과하게 되면 이 때 발생하는 고정상과 이동상에서 시료의 농도변화는 다음의 일차 편미분 방정식으로 표현된다. 성분 i에 대해, 다음과 같은 물질수지식에 세워진다.

$$u \frac{\partial c_i}{\partial x} + \epsilon \frac{\partial c_i}{\partial t} + (1 - \epsilon) \frac{\partial q_i}{\partial t} = 0 \quad (3)$$

u는 이동상의 선속도이고, ϵ 은 공극률이다. 식 (3)은 축방향 확산을 고려하지 않은 식이다. 식 (3)과 식 (2)를 풀기 위해 유한차분법이 사용될 수 있다. 특히 두 편미분방정식이 동시에 야기되는 경우 해석해가 없기 때문에 식 (3)은 식 (4)로 다시 쓰고,

$$u \Delta t (c_{x+\Delta x, t} - c_{x, t}) + \epsilon (c_{x+\Delta x, t+\Delta t} - c_{x+\Delta x, t}) + (1 - \epsilon) (q_{x+\Delta x, t+\Delta t} - q_{x+\Delta x, t}) = 0 \quad (4)$$

축방향 확산을 고려하지 않은 대신 칼럼방향으로의 Δx 를 HETP (height equivalent to a theoretical plate)로 가정한다. 해를 구하기 위해 Langmuir 흡착평형식의 매개변수 a, b를 알아야 하며 아래 식에서 구할 수 있다.

$$q = aC = k \frac{\epsilon}{1 - \epsilon} C \quad (5)$$

여기서 a는 매우 희석된 농도에서의 평형상수값을 취한 것이고 주입부 피크 체류시간을 외삽하여 희박농도에서의 체류시간을 구한 후 평형상

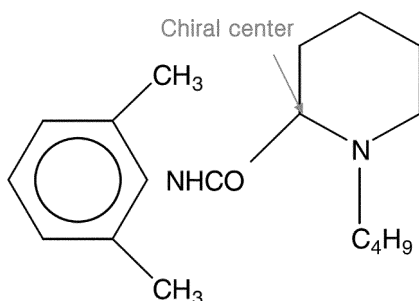


Fig. 1. Structure of bupivacaine.

수 값을 구하였다. 매개변수 b 값은 임의의 값을 선정한 후, 식 (4)를 이용하여 용출곡선을 계산하였다. 계산된 용출곡선과 실험값을 비교하여 일치하도록 반복계산을 통하여 매개변수 b 값을 얻었다[10]. k 는 체류인자이다. 이러한 수치해석은 SMB 전산모사프로그램인 Aspen chromatography에 의해 수행하였다.

3. 실험 장치 및 방법

3-1. 시약 및 전처리 방법

분리대상물질인 Bupivacaine hydrochloride, [1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-piperidinecarboxamide]와 S-Bupivacaine은 Sigma Aldrich사의 제품을 사용하였다. 시료성분에 있는 hydrochloride를 제거하기 위해 sodium-hydrocarbonate(Kanto Chemical Co., Inc.)와 methylene chloride(Baker analyzed[®] HPLC reagent), water(Baker analyzed[®] HPLC reagent)를 사용하였다. 실험에 사용한 이동상 용매는 hexane(95% n-hexane Baker analyzed[®] HPLC reagent), 2-propanol(Baker analyzed[®] HPLC reagent), acetic acid(Baker analyzed[®] HPLC reagent), triethylamine(99.5% Aldrich Chem. Co.)이다.

크로마토그래피 이동상에 적용하기 위해 시료의약품은 다음과 같은 전처리 순서에 의해 진행된다. 순수한 성분의 라세미 Bupivacaine을 얻기 위해 Bupivacaine hydrochloride 3 mg당 과포화 sodium-hydrocarbonate 수용액과 DCM(methylene chloride)을 2 ml 비율로 준비한다. 이때, 과포화 상태의 sodium-hydrocarbonate는 3차 증류된 물 100 ml당 sodium-hydrocarbonate를 7 g 이상으로 넣어 준비하였다. 일정량의 시료를 준비된 DCM에 먼저 녹인다. 시료가 완전히 DCM에 녹은 후 준비된 과포화 sodium-hydrocarbonate 수용액을 넣어 준 후, 두 상간에 물질전달이 용이하도록 1 분간 흔들어 준다. 평평한 곳에 놓아두어 두 액간의 비중차로 인해 상분리가 될 때까지 놓아 둔다. 이 때 순수한 성분의 Bupivacaine은 DCM상에 존재하고 불순물인 hydrochloride는 과포화 sodium-hydrocarbonate 수용액에 존재하게 된다. 비중이 상대적으로 높은 DCM을 분별깔때기를 이용하여 분리한다. 분리한 DCM 용액을 가열기나 evaporator를 이용하여 휘발시킨다. 이 때 생긴 결정들을 모아 실험에 사용하였다.

3-2. 고정상 및 단일칼럼에 의한 크로마토그래피 분리

본 실험에 사용된 키랄고정상은 Kromasil[®] CHI-TBB(Eka Chem., Sweden)이며 O,O-bis(4-tert-butylbenzoyl)-N,N-diallyl-L- tartar diamide의 키랄 monomer가 silica에 결합된 것으로 입경은 10 μ m, 세공크기는 100 Å이다. HPLC 칼럼은 Kromasil[®] CHI-TBB를 내경이 1 cm, 길이가 10 cm인 stainless-steel 칼럼(Alltech)에 슬러리 팩킹하여 사용하였다. 팩킹 물질을 충전하기 위한 장치로는 slurry packer(Alltech model 1666)를 사용하였다. Kromasil[®] CHI-TBB를 슬러리 상태로 만들어 주기 위한 용매로는 methanol(ChromAR[®] HPLC)을 사용하였으며 슬러리로 분산하기 위해 sonicator를 사용하였다. 이 때 충전 칼럼에 압력을 가하기 위한 용매로는 methanol/acetone [50/50, v/v%]를 사용하였다. Kromasil[®] CHI-TBB를 충전하기 위한 절차는 methanol 20 ml에 Kromasil[®] CHI-TBB 3.3 g을 넣고 sonicator를 사용하여 30초 정도 분산시킨 후 SSI reservoir에 넣는다. 그리고 air regulator를 이용하여 air pressure를 60 psi까지 증가시킨 후 가압 용매의 압력을 1분 사이에 7,000 psi까지 증가하여 Kromasil[®] CHI-TBB를 칼럼에 충전하였다. 칼럼 충전의 확인은 SSI reservoir의 부피가 20 ml이므로 충전된 칼럼을 통해 배출되는 methanol의 부피가 SSI reservoir 부피의 두배 이상 흘러나왔을 때 가압용매의 압력을 줄여주고 팩킹 칼럼과 SSI reservoir를 분해하여 칼럼의 팩킹을 확인하였다[11]. 실험에서 사용한 실험장치는 고압펌프(Young-Lin[®] M930), injection system(syringe+sample loop), gradient mixer(Waters), UV

spectrometer(Young-Lin[®] M720), data acquisition(Young-Lin[®], Autochrowin)으로 이루어져 있다. 유출되는 성분은 UV detector에서 검출한 뒤 데이터 모듈에 연결되어 모듈에서 PC로 데이터를 전달하여 peak의 면적과 높이, retention time 등을 얻을 수 있게 하였다. 실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 시작하기 전 정상상태에 이를 때까지 약 1시간 가량 이동상으로 씻어 주고 약 30분간 탈기한 후 사용하였다. 이동상의 흐름을 조절하기 위해 이동상의 유량을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0(ml/min)로 변화시키면서 실험을 하였다. 시료의 주입은 주사기를 사용하여 샘플 루프를 5, 10, 20(μ l)로 바꾸어주면서 주입부피에 변화를 주어 각 성분의 크로마토그램을 얻었으며 UV detection은 240 nm로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다.

이 실험에서 고정상으로 사용되는 Kromasil[®]은 이동상이 n-hexane, tert-butylmethyl ether와 같은 비극성용매를 주로 사용한다. 그 외에 분리효율을 높이기 위해 acetic acid, triethylamine과 같은 첨가제가 소량 사용된다. 분리하고자 하는 물질이 라세미 Bupivacaine과 같은 염기성 물질인 경우 acetic acid 0.1-0.2(vol.%) 첨가하거나, acetic acid 0.1-0.2(vol.%)와 triethylamine 0.1(vol.%)정도 혼합된 상태로 이동상에 첨가하도록 되어 있다. 따라서 이동상의 조성은 기본적으로 n-hexane, 2-propanol, acetic acid, triethylamine의 사성분계로 하였다.

3-3. SMB 공정

Fig. 2에서 보는 바와 같이 SMB lab-unit는 각 zone이 2개의 칼럼으로 이루어진 2-2-2-2 구성으로 Kromasil로 HPLC칼럼과 동일한 방법으로 슬러리 팩킹한 내경 1 cm, 길이 10 cm인 HPLC용 칼럼 8개, Valco사의 멀티포지션 밸브 5개, 체크 밸브 8개, 용매이송 펌프(Yong-Lin M925) 4개, 미터링 밸브, 릴리프 밸브로 구성되어 있다. 또한 멀티포지션 밸브는 일정시간에 위치가 변할 수 있도록 컴퓨터 프로그램으로 제어하였다.

SMB공정에서 용매 및 용질의 흐름구성은 solvent, extract, feed, raffinate flow 및 recycle로 이루어져있고 위치변경은 5개의 8 포트 멀티포지션 밸브를 컴퓨터프로그램인 HplcCtrl[®]에 의해 원하는 시간 경과 후에 밸브를 움직이게 하였다. Tubing은 1/16"로 0.25 mm ID, 1 mm ID를 사용하였고 체크밸브로 흐름 방향을 결정하였고, extract에서 미터링 밸브와 릴리프 밸브, raffinate에서는 펌프와 릴리프 밸브로 유량을 조절하였다. 4개의 칼럼으로 이루어진 경우 SMB 시스템내에서 이동상의 흐름을 보여주는 것으로 칼럼 하단의 2개의 멀티포지션 밸브는 용매와 시료, 상단의 3개의 멀티포지션 밸브는 extract, raffinate, recycle에 연결된 것이다. Recycle과 용매가 칼럼으로 도입되는 부분의 이동상의 흐름은 체크밸브는 닫히게 되어, 멀티포지션 밸브를 통해 recycle된 용매와 같이 칼럼으로 흐르게 된다. 또한 일정시간(switching time)마다 멀티포지션 밸브에 의해 용매의 도입 부분이 다음 컬럼으로 이동하므로 그 다음의 체크밸브가 닫히게 된다. 체크밸브의 O-ring의 재질은 사용하는 용매에 따라 결정하며 사용한 체크밸브의 최대압력은 3,000 psi이므로 용매펌프의 유량은 최대압력이 3,000 psi 이하에서 정해야만 한다. Raffinate와 extract에서 유량을 조절하고 약 15시간 정도 후 SMB 시스템이 완전하게 안정화된 이후에 raffinate, extract 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플은 분석용 HPLC를 이용하여 UV-detector $\lambda=240$ nm, 펌프의 유량은 1 ml/min, 상온에서 분석하였다.

4. 결과 및 토론

4-1. 단일칼럼의 결과 및 해석

라세미 Bupivacaine을 광학 분리할 목적으로 Kromasil[®] CHI-TBB를 slurry packing 한 칼럼을 실험에 사용하였다. 먼저 Bupivacaine의 이동상에 대한 용해도가 매우 낮아서 적합한 시료 용매를 찾기 위해 다양한

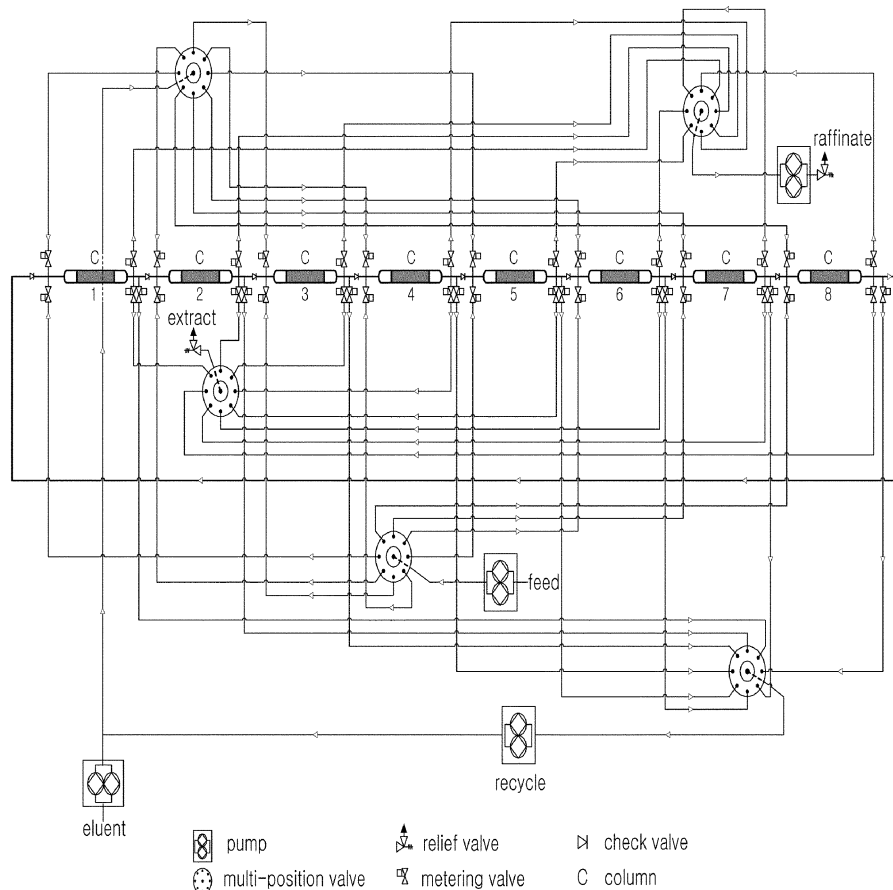
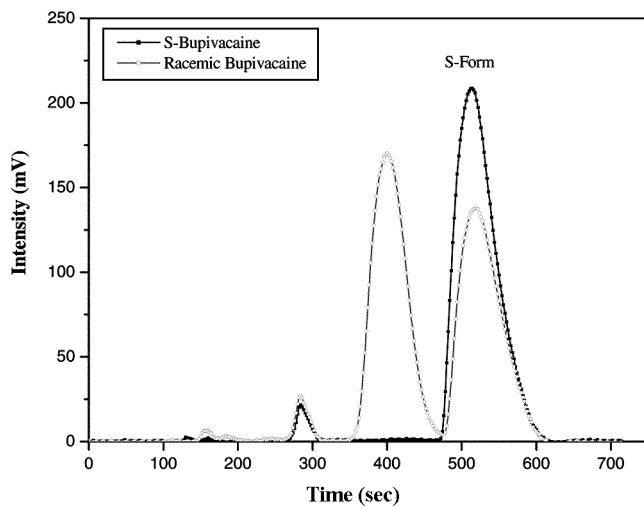
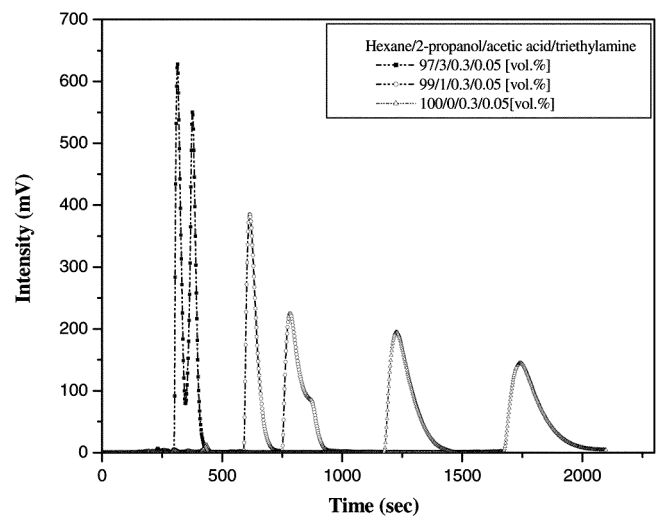


Fig. 2. Schematic diagram of SMB process.

Fig. 3. Chromatograms of racemic bupivacaine and S-Bupivacaine. Injection concentration of 15 mg/ml in hexane/2-propanol (92/8, vol.%). Injection volume of 5 μ l.

용매를 사용하여 실험하였다. Bupivacaine을 hexane/2-propanol(92/8, vol.%)에 녹여서 분리했을 때 다른 용매에 비해 좋은 용해도를 보임으로 적합한 시료용매로 선정되었다. 라세미 Bupivacaine을 분리한 크로마토그램에서 두 개의 피크 중 라세미 Bupivacaine의 S-enantiomer과 R-enantiomer을 구분하기 위해서 주입농도 15 mg/ml, 주입부피 20 μ l로 하고 순수한 S-Bupivacaine을 구입하여 실험을 하였다. 그 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 두 피크 중 분리시간 520초에 일치하는 피크가 S-enantiomer

Fig. 4. Chromatograms with various mobile phase compositions. Injection concentration of 5 mg/ml. Injection volume of 20 μ l.

임을 확인하였다. 300초대에 보이는 피크는 이동상 성분 중 고정상과 친화력을 보이는 2-propanol의 피크이다.

다음은 시료의 분리에 적합한 이동상의 조성을 결정하기 위한 실험을 하였다. 먼저 acetic acid와 triethylamine의 양을 각각 0.3, 0.05(vol.%)로 고정하고 n-hexane의 양을 각각 90, 92, 94, 97, 99, 100(vol.%)으로 변화시켰다. n-hexane의 양이 94%에 이를 때까지는 분리가 이루어지지 않다가 Fig. 4에서 보는 것과 같이 97%이상으로 증가할수록 분리도와

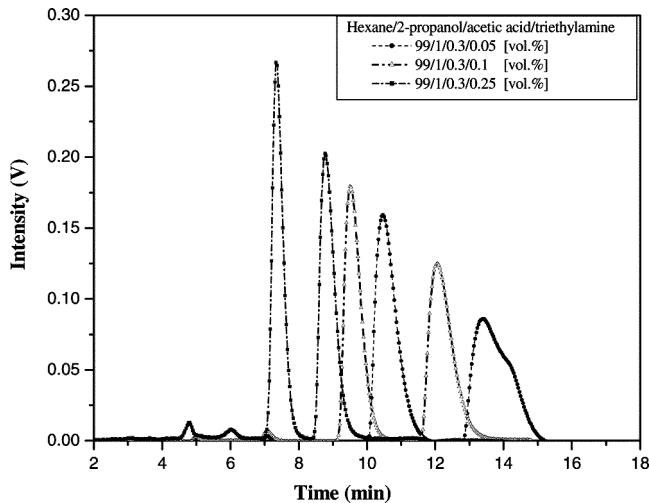


Fig. 5. Chromatograms with various compositions of triethylamine. Injection concentration of 5 mg/ml. Injection volume of 20 μ l.

체류시간이 증가되는 것을 알 수 있었다. 2-propanol을 제외한 hexane/acetic acid/triethylamine의 3성분계로 실험을 했을 때는 분리도가 가장 좋았으나 분리시간이 30분 이상으로 늘어남을 알 수 있다. 이는 분리 과정이 고정상의 키랄 선택성과 시료간의 수소결합을 통해 분리가 이루어지기 때문에 키랄선택성과 쉽게 수소결합을 할 수 있는 알코올류인 2-propanol의 양이 많아지게 되면 고정상에 흡착되어 있던 시료가 쉽게 탈착이 진행되어 체류시간이 감소하게 되고 분리도 역시 감소하게 되기 때문이다. 따라서 최종실험조건은 n-hexane과 2-propanol의 양을 분리도와 분리시간을 고려하여 99/1(vol.%)로 결정하였다.

다음은 첨가제인 acetic acid와 triethylamine의 양을 변화시켰다. 먼저 Fig. 5는 hexane/2-propanol/acetic acid의 조성을 99/1/0.3(vol.%)로 일정하게 하고 첨가제인 triethylamine의 양을 0, 0.05, 0.1, 0.25(vol.%)로 변화시켜 체류시간을 알아보았다. Triethylamine의 양이 증가할수록 피크의 sharpness가 증가하고 체류시간도 짧아지는 경향을 보였다.

또 다른 첨가제인 acetic acid의 부피비를 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%까지 다르게 하여 실험한 용출곡선이 Fig. 6에 나타나 있다. Acetic acid가 없을 경우에는 전혀 분리가 되지 않다가 그 양이 증가할수록 분리도가 증가하여 부피비가 0.3%에 이르렀을 때 분리도가 가장 좋고 그 뒤로는 오

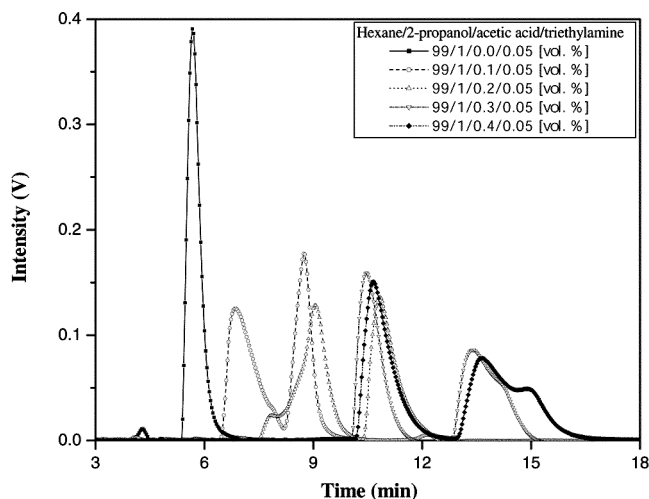


Fig. 6. Chromatograms with various compositions of acetic acid. Injection concentration of 5 mg/ml. Injection volume of 20 μ l.

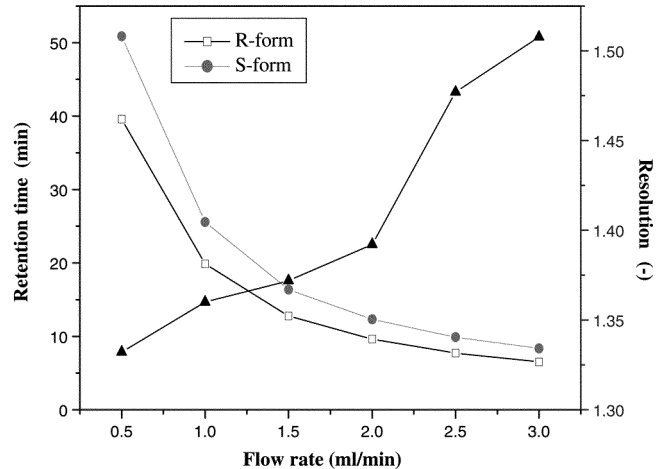


Fig. 7. Effect of flow rate on resolution and retention times. Injection concentration of 15 mg/ml. Injection volume of 5 μ l.

히려 감소하는 것을 알 수 있었다. 위 실험의 결과를 통해 보듯이 시료의 분리에 적합한 이동상의 조성비는 hexane/2-propanol/acetic acid/triethylamine의 부피비가 각각 99/1/0.3/0.05(vol.%)일 때임을 알 수 있다.

Fig. 7은 Bupivacaine의 농도가 15 mg/ml일 때 분리도와 각각 이성질체의 체류시간 비교그래프이다. 유속이 증가할수록 분리시간은 현저하게 짧아짐을 알 수 있다. 유속이 0.5 ml/min 일 때는 R, S-form의 분리가 40분과 50분에 걸쳐 이루어지나 유속이 1.5 ml/min으로 증가하면 분리시간은 각각 20분 이내로 줄어들었다. 분리도는 유속이 0.5 ml/min일 때 1.32이고 유속이 1.5 ml/min일 때는 1.40으로 3.0 ml/min일 때는 1.53으로 증가하여 유속이 증가할수록 분리시간은 짧아지고 분리도는 높아짐을 알 수 있다. 분리도만을 본다면 유속이 3.0 ml/min 이 가장 좋지만 두 피크간의 간격이 초단위로 짧아져 SMB로 조업시 스위칭타임을 잡기에 힘들어지므로 분리시간과 조업조건을 모두 고려하였을 때 유속이 1.5 ml/min 일 때가 단일칼럼실험으로 적당한 유속으로 사료된다.

4.2. 매개변수 측정 및 전산모사 해석

크로마토그래피를 이용한 공정에서 흡착평형식은 그 공정을 이해하고 예측할 수 있는 중요한 자료이다. SMB공정에서도 흡착평형식을 결정 한 후 이를 통해 초기 운영조건을 설명할 수 있게 된다. SMB 크로마토그래피는 회분식 크로마토그래피에 비해 많은 장점을 가지고 있으나 공정의 설계에 10개 이상의 변수가 연관되어 어려움이 가중된다. 그러므로 SMB 크로마토그래피의 운전 조건 도출을 위해서는 많은 변수들이 상호 연관되어 있어 체계적인 실험방법을 도입하지 않는 경우, 상당히 불필요한 시간과 노력을 기울여야 한다. 이러한 SMB의 운전 조건 도출은 관련된 변수들의 다양함으로 인해 많은 시행착오를 줄이기 위해서 전산모사가 필요하다.

매개변수 측정 실험을 위해 전처리 과정을 거친 Bupivacaine을 n-hexane에 녹여 농도가 1, 5, 10, 20 mg/ml가 되도록 준비하였다. 각 농도를 주입부피 20 μ l, 유속은 2 ml/min으로 고정하였다. 동일한 유속과 동일한 이동상의 조건에서 무용 시간을 알아보기 위하여 n-hexane을 20 μ l를 주입하였다. Fig. 8은 주입 농도에 따른 Bupivacaine의 크로마토그램이다. Fig. 8에서 보는 것과 같이 칼럼에 주입되는 시료의 양이 증가함에 따라 체류시간이 감소하는 경향을 보였다. 피크의 모양도 점차 피크의 폭과 비선형성이 증가되는 전형적인 Langmuir의 형의 피크임을 알 수 있다. 또한 Fig. 3의 racemate상태의 Bupivacaine를 주입하고 순수한 S-Bupivacaine만을 주입하였을 때의 용출곡선을 비교하였을 때 S-Bupivacaine이 racemate Bupivacaine에서 단일 성분일 때보다 좀

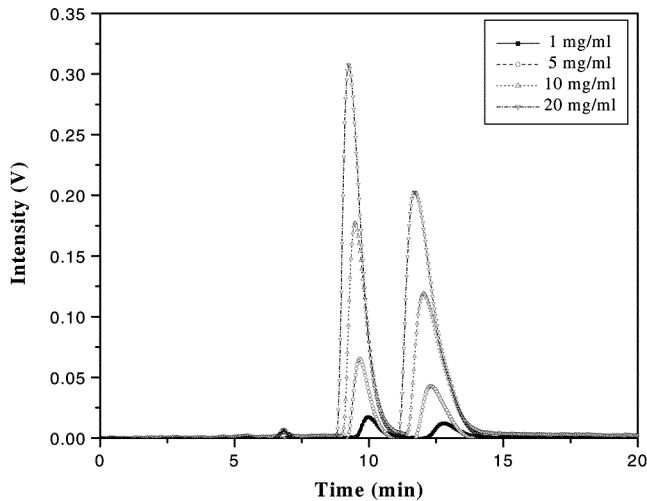


Fig. 8. Elution profiles of Bupivacaine. Injection volume of 20 µl.

더 먼저 용출됨을 알 수 있다. 이는 S-Bupivacaine과 R-Bupivacaine이 서로의 흡착에 영향을 주는 경쟁적관계임을 보여주는 것이다. 따라서 이성질체의 등온흡착곡선식으로 Competitive Langmuir 형태를 사용하였다. 식 (2)에 포함되는 각각의 매개변수를 얻기 위해 먼저 주입농도에 따른 체류시간을 외삽하여 매우 희석된 농도에서의 체류시간을 구하였다. 이를 통해 평형상수 값을 구하여 매개변수 a 로 사용하였을 때 R-Bupivacaine의 경우 6.20 mg/ml, S-Bupivacaine의 경우 8.79 mg/ml이었다. 매개변수 b 는 식 (5)를 이용하여 시행오차법을 통하여 구하였다. 구해진 매개변수 b 값은 각각 R-Bupivacaine의 경우 0.364 ml/mg, S-Bupivacaine의 경우 0.922 ml/mg이었다. 각각의 흡착평형식에 매개변수를 대입하여 정리하면 다음과 같다.

$$q_{R-for m} = \frac{6.20c_{R-for m}}{1 + 0.364c_{R-for m} + 0.922c_{S-for m}} \quad (6)$$

$$q_{S-for m} = \frac{8.79c_{S-for m}}{1 + 0.364c_{R-for m} + 0.922c_{S-for m}} \quad (7)$$

이렇게 구한 흡착평형식을 이용하여 SMB 전산모사를 수행하였다. 사용된 소프트웨어는 Aspen Chromatography 11.1 service pack 1(Aspen tech. USA)로써 펜티엄 III급 컴퓨터에 설치하여 사용하였다. 컴퓨터의 운영체제는 Windows 2000 Professional service pack 3로 설치하여 사용하였다. 각각의 SMB 구성은 2-2-2-2로 하였으며, 편미분 계산 방법은 UDS1, node는 35로 설정하였으며, 물질전달은 convection with estimated dispersion로 가정하였다. 칼럼 내의 압력 강하는 constant pressure with constant velocity로 설정하였으며, kinetic 모델은 Solid linear lumped resistance로 설정하였다. 각각 이성질체의 등온흡착곡선식은 Competitive Langmuir 형태를 사용하였다.

전산 모사과정 중에 convection with estimated dispersion을 통해 확산 계수를 구한다[12]. 이 식에 필요한 레이놀드 수를 구하기 위해서 이동상의 밀도와 점도에 대한 값을 구하였다. 먼저 밀도는 이동상에 들어가는 용매의 순수 밀도를 mixing rule을 이용하여 구하였다. 점도는 각 용매의 순수한 상태에서의 점도와 분자식을 이용하여 각 용매간의 분자간의 인력을 고려된 Grunberg and Nissan 방법[13]을 이용하여 계산하였다. 각각의 계산 방법을 통해 얻은 이동상의 밀도는 665.81 kg/m³이고 점도는 0.3404 cP이다. 물질전달계수는 400,000/min로 가정하여 입력하였다.

먼저 Aspen Chromatography를 이용하여 흡착평형식이 실험치와 일치하는지 확인하였다. 단일칼럼에서 얻은 크로마토그램을 검량하여 Fig. 9

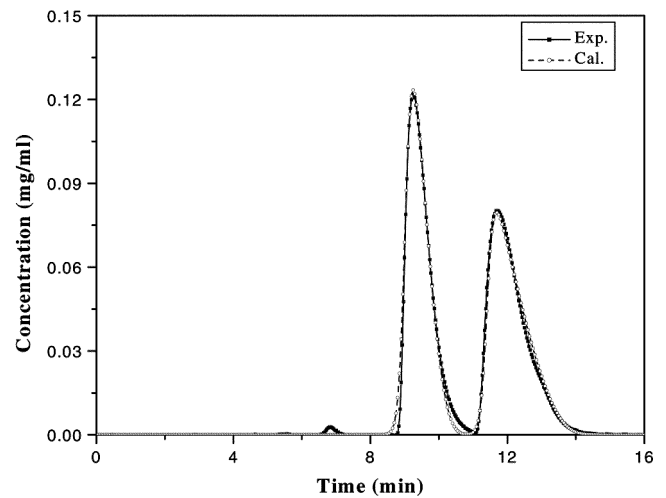


Fig. 9. Comparison of chromatogram of bupivacaine between calculated data and experimental data. Flow rate 2 ml/min. Injection concentration of 20 mg/ml.

와 같은 농도 곡선을 얻었다. Aspen chromatography를 사용하는 경우 주입부피가 0.1 ml 이하인 경우 크로마토그램을 얻을 수 없어 주입부피를 0.2 ml로 하고 농도를 주입 농도의 10배 희석시켜 주입량이 동일하도록 하여 수행하였다. 동일한 유속에 동일한 칼럼을 사용하였을 때 칼럼에 주입되는 시료의 양이 동일할 경우 크로마토그램에 나타나는 체류시간은 비슷한 값을 가지게 된다. 이를 통해 PIM을 이용하여 구한 흡착평형식을 검증하였을 때 동일한 체류시간을 가졌다. 구해진 흡착 평형식을 이용하여 전산 모사와 비교하였을 때 Fig. 9에서처럼 비교적 잘 일치하였다.

농도가 낮은 경우 시료는 칼럼에서 선형적인 거동을 보이며, 이동상과 고정상 내에서의 시료의 농도는 일정한 값으로 증가하는 선형 흡착 평형식을 가지게 된다. 선형 흡착평형식을 가지는 경우 SMB 운전 조건은 triangle theory를 통한 간단한 계산 결과를 통해 쉽게 최적 조건을 도출할 수 있다[14]. 이 경우, 고려해야 할 사항은 SMB 장비의 연결부간의 빈 공간에 의한 무용 부피만을 고려해야 한다.

하지만, 실제 공정에서 유용한 운영조건의 경우 낮은 농도가 아닌 일정 농도 이상에서 운전해야 하는 경우가 있다. 이 경우 칼럼 내에서 시료는 비선형적인 거동을 보이며, 단일칼럼을 통해 얻은 용출곡선 역시 좌우 비대칭적인 피크를 얻게 된다. 또한 시료의 주입농도의 증가로 인해 분리도는 감소하게 되고 이로 인해 최적의 분리 조건에 해당하는 영역은 감소하게 되어 최적 조건을 도출하기 어렵다. 실제 라세미 Bupivacaine의 경우 SMB 운영 조건에서의 시료의 농도는 1.5 mg/ml로서 단일칼럼에서 얻은 용출곡선(Fig. 10)은 좌우비대칭적인 비선형의 Langmuir 형태로 나오는 것을 알 수 있다[15].

따라서 Competitive Langmuir 식을 결정한 후 intra-particle porosity를 고려하여 Table 1과 같은 조건을 도출하였다. 이러한 조건에서 SMB 실험을 한 결과, 실험값은 extract에서 57.85%, raffinate에서 9.3%의 순도로 얻을 수 있었다. 실제 전산모사에서 triangle theory를 이용하여 최적의 조건을 도출하여 운전하였지만, 실험에서 보는 것과 같이 raffinate에서는 상대적으로 친화력이 낮은 R-Bupivacaine의 농도보다 상대적으로 친화력이 높은 S-Bupivacaine의 농도가 많이 나왔다. 또한 Table 1에서 보듯이 전산모사의 extract의 순도가 47.58%인데 비해 실제 실험값은 57.58%으로 약간의 차이를 보임을 알 수 있다. 이는 스위칭 시간이 빠르게 설정될 경우 나오는 결과로써 intra particle porosity를 고려하므로써 triangle theory의 m_2 , m_3 값이 작아져서 발생한 문제로 생각된다.

Intra particle porosity를 고려하지 않는 상태에서 SMB 운영조건을 설

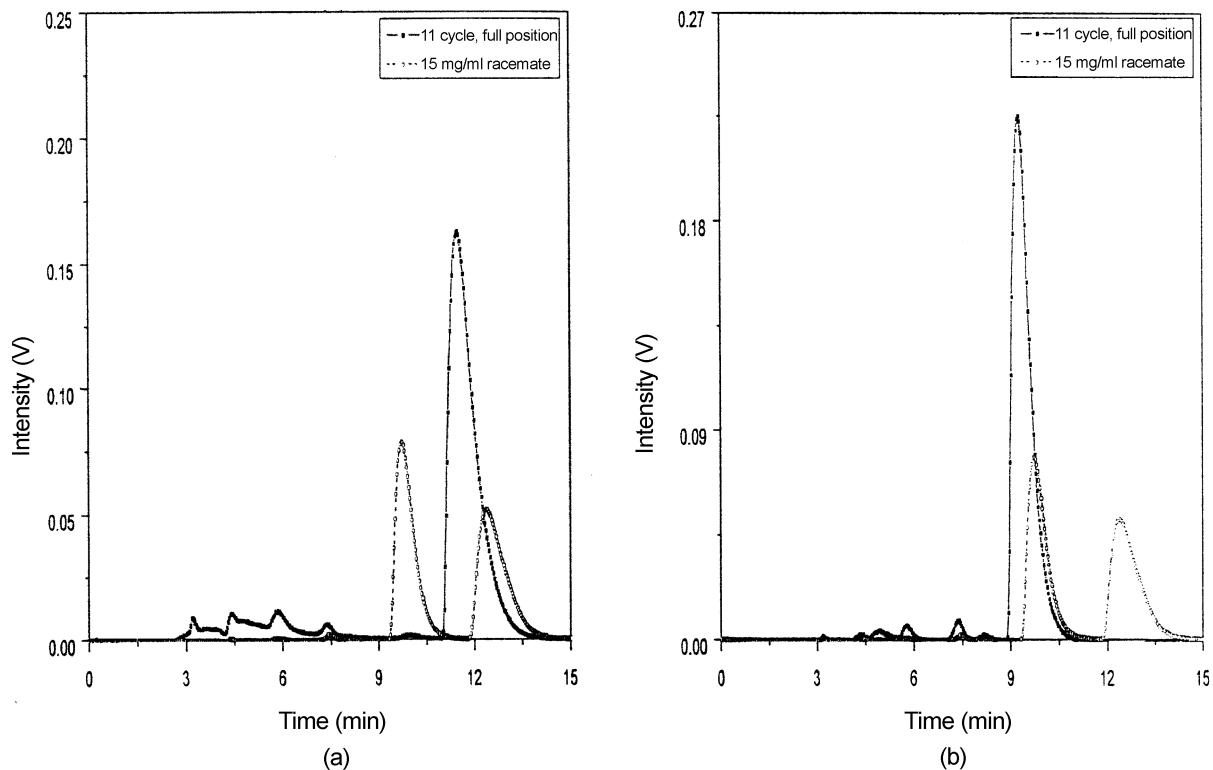


Fig. 10. Chromatogram of Bupivacaine extract (a) and raffinate (b) at 11th cycle.

Table 1. SMB operating conditions and purities of extract and raffinate by considering intra particle porosity

Conditions		Results		
t^* (min)	10	Purity(%)		
Feed (ml/min)	0.1		Predicted	Experimental
Desorbent (ml/min)	0.86	Extract	47.58	57.58
Raffinate (ml/min)	0.3			
Extract (ml/min)	0.66	Raffinate	9.3	9.3
Recycle (ml/min)	1.0			

Feed concentration of 1.5 mg/ml

Table 2. SMB operating conditions and purities of extract and raffinate without considering intra particle porosity

Conditions		Results		
t^* (min)	15	Purity(%)		
Feed (ml/min)	0.1		Predicted	Experimental
Desorbent (ml/min)	0.86	Extract	98.66	100
Raffinate (ml/min)	0.3			
Extract (ml/min)	0.66	Raffinate	99.29	100
Recycle (ml/min)	1.0			

Feed concentration of 1.5 mg/ml.

정하였을 때의 결과가 Table 2이다. Table 1의 조건 중 농도와 각 포트에서의 유속을 동일하게 하고 스위칭 시간을 15분으로 증가시킨 조건으로 이를 통해 전산 모사를 수행한 결과 각각의 이성질체가 고순도(99-100%)로 분리되는 결과를 얻을 수 있었다. 이 조건하에서 실제 실험을 수행하여 전산모사 결과와 비교하였을 때 잘 일치하고, 각 광학이성질체의 100% 분리가 이루어짐을 확인할 수 있었다.

Fig. 10은 Table 2조건에서의 SMB운용시 11사이클 전체를 분취하여 용매를 휘발시킨 후 분석용 HPLC로 얻은 크로마토그램이다. 분취한 용액의 농축 정도는 5 ml의 n-hexane에 bupivacaine 0.75 g을 extract의 경

우 약 15.84배 정도, raffinate의 경우 7.2배 정도까지 농축시켰다. 따라서 extract의 농도는 약 0.946 mg/ml, raffinate의 농도는 약 2.08 mg/ml 정도이다. 각각의 농도에서 Extract와 Raffinate에서의 고순도(99-100%)로 R-form과 S-form이 분리되어 나옴을 확인하였다.

5. 결 론

본 연구에서는 고부가가치를 갖고 있는 키랄의약품을 SMB 크로마토그래피를 이용하여 단일 이성질체로 광학분리하고 최적의 운전 조건을 찾기 위한 실험을 수행하였다. Bupivacaine은 산부인과 국소마취제이다. 약리적 활성을 갖는 S-(-)-Bupivacaine을 분리해 내기 위해 키랄 고정상인 Kromasil® CHI-TBB 충전제를 1.0×10 cm 칼럼에 slurry packing 하여 HPLC를 이용한 실험을 하였다.

먼저 최적의 이동상 조건을 얻기 위해 제조사에서 권고한 hexane, 2-propanol, acetic acid, triethylamine의 4가지 시약으로 단일칼럼실험을 하였다. 단일칼럼에서 이동상 조건이 n-hexane/2-propanol/acetic acid/triethylamine=99/1/0.3/0.05(vol.%)일 때 각각의 광학이성질체가 100% 분리되었다.

이와 같은 이동상 조건에서 동적방법인 PIM을 이용하여 흡착평형식을 구하였다. 구한 흡착평형식을 바탕으로 전산모사프로그램인 Aspen chromatography 11.1 service pack를 이용해 전산모사를 수행하여 최적의 SMB 운전조건을 도출하였다. 실험에 사용된 SMB의 구성은 2-2-2-2이며 사용된 칼럼사이즈는 1.0×10 cm 이었다. 운영조건은 라세미 Bupivacaine의 농도가 1.5 mg/ml일 때, 스위칭시간은 15분, 피드의 유속은 0.1 ml/min, 용매의 유속은 0.86 ml/min, extract의 유속은 0.66 ml/min, raffinate의 유속은 0.3 ml/min, 리사이클의 유속은 1 ml/min이었다. 실험 결과와 전산모사 결과를 비교하였을 때 오차 2%내에서 잘 일치하였으며, 고순도(99-100%)로 분리되었다. 이렇듯 본 연구결과에서는, 많은 실험을 통해 SMB 운전조건을 도출했던 기존의 실험보다 전산모사를 병행하여 운전도출을 하는 것이 노력과 시간을 감소시키는데 유용하다고

사료된다.

본 실험을 통해 키랄 의약품 분리를 위한 SMB 운전 조건을 도출할 수 있었으며 다양한 변수들이 SMB 운전능력에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 자료의 축적은 추후 실제 공정의 모사에 중요한 자료를 제공할 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 과학기술부 신화학공정기술사업단의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 또한 크로마토그래피 전산모사를 위해 도움을 주신 인하대학교 한순구님에게 감사드립니다.

사용기호

ϵ	: bed porosity
K	: equilibrium constant
L	: column length [cm]
$q_{s,i}$: column saturation capacity of component i
R	: resolution
t_R	: retention time [min]
t^*	: switching time [min]
t_0	: dead time [min]
w	: bandwidth [min]

참고문헌

- Hyun, M. H., "Separation of Optical Isomers by Liquid Chromatography," Minyum-Sa, Seoul, Chapter 2, Korean(1996).
- Pirkle, W. H., Finn, J. M., in J. D. Morrison (Ed.), "Asymmetric Synthesis," Academic Press, New York(1983).
- Broughton, D. and Gerhold, C., "Continuous Sorption Process Employing Fixed Bed of Sorbent and Moving Inlets and Outlets," U.S. Patent No. 2,985,589(1961).
- Nagamatsu, S., Murazumi, K. and Makino, S., "Chiral Separation of a Pharmaceutical Intermediate by a Simulated Moving Bed Process," *Journal of Chromatography A*, **832**, 55-65(1999).
- Juza, M., "Development of an High-Performance Liquid Chromatographic Simulated Moving Bed Separation from an Industrial Perspective," *Journal of Chromatography A*, **865**, 35-49(1999).
- Küstners, E., Heuer, C. and Wiecekhusen, D., "Purification of an Ascomycin Derivative with Simulated Moving Bed Chromatography. A Case Study," *Journal of Chromatography A*, **874**, 155-165(2000).
- Pais, L. S., Loureiro, J. M. and Rodrigues, A. E., "Separation of 1,1'-bi-2-Naphthol Enantiomers by Continuous Chromatography in Simulated Moving Bed," *Chemical Engineering Science*, **52**, 245-257(1997).
- Tahraoui, A., Watson, D. G., Skellern, G. G., Hudson, S. A., Petrie, P. and Faccenda, K., "Comparative Study of the Determination of Bupivacaine in Human Plasma by Gas Chromatography-mass Spectrometry and High-performance Liquid Chromatography," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, **15**, 251-257(1996).
- Gu, X. Q., Fryirs, B. and Mather, L. E., "High-Performance Liquid Chromatography Separation and Nanogram Quantitation of Bupivacaine Enantiomer in Blood," *Journal of Chromatography B*, **719**, 135-140(1998).
- Haarhoff, P. C. and van der Linde, H. J., "Concentration Dependence of Elution Curves in Non-Ideal Gas Chromatography," *Analytical Chemistry*, **38**, 573-582(1966).
- Kim, S. Y., Lee, J. K., Suh, S. S., Choi, M. H., Park, T. J. and Park, D. K., "Optical Separation of Racemic Ketoprofen by Chiral High-performance Liquid Chromatography," *HWAHAK KONGHAK*, **39**(6), 698-704(2001).
- Grunberg, L. and Nissan, A. H., "Mixture Law for Viscosity," *Nature*, **164**, 799-800(1949).
- Slater, M. J., "The Principles of Ion Exchange Technology," Butterworth-Heinemann(1991).
- Pedefferri, M., Zenoni, G., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., "Experimental Analysis of a Chiral Separation Through Simulated Moving Bed Chromatography," *Chemical Engineering Science*, **54**, 3735-3748(1999).
- Mazzotti, M., Storti, G. and Morbidelli, M., "Optimal Operation of Simulated Moving Bed Units for Nonlinear Chromatographic Separations," *Journal of Chromatography A*, **769**, 3-24(1997).